

1/9/1 (Item 1 from file: 351)
DIALOG(R)File 351:DERWENT WPI
(c)1996 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

008422487 WPI Acc No: 90-309488/41
XRAM Acc No: C90-133724

Novel human macrophage migration inhibitory factor - prepd. by
culturing human T-cell fusion strain which secretes inhibitory factor

Index Terms: NOVEL HUMAN MACROPHAGE MIGRATION INHIBIT FACTOR; PREPARATION
CULTURE HUMAN CELL FUSE STRAIN SECRETION INHIBIT FACTOR

Patent Assignee: (SANY) SANKYO KK; (ELED) DENKI KAGAKU KOGYO KK

Number of Patents: 001

Patent Family:

CC Number	Kind	Date	Week
JP 2219586	A	900903	9041 (Basic)

Priority Data (CC No Date): JP 8939572 (890220)

Abstract (Basic): JP 2219586

The novel human macrophage migration inhibitory factor (MIF) has
(1) mol.wt. 35,000-45,000 by gel filtration method, (2) isoelectric
point: $pI=7.5+0.5$ by chromato-focusing method, (3) loses macrophage
migration inhibiting activity by 50% by heating to 56 deg.C for 30

min.. (4) loses activity at pH 4.0 or less and pH 10.0 or more. (5)
shows maximum UV absorption at 280 nm, (6) loses activity by trypsin
treatment, (7) loses the activity by L-fucose, (8) shows specific
activity against macrophages of human beings and other animals, and (9)
is different from interferon gamma, interleukin 1, tumor necrosis
factor, and granulocyte macrophage stimulating factor.

A method for producing the factor by culturing human T cell
fusion strain which secretes MIF is also claimed.

USE/ADVANTAGE - Inhibits macrophage migration, esp. in a primary
stage of inflammation. By determining MIF in serum or plasma,
inflammation can be diagnosed. MIF can also promote resistance against
infections such as tuberculosis, Hunsen disease, Candida, and tumours.

@(7pp Dwg.No.0/0)@

File Segment: CPI

Derwent Class: B04; D16;

Int Pat Class: C07K-015/06; C12P-021/00

⑫ 公開特許公報 (A) 平2-219586

⑬ Int. Cl.⁹C 12 P 21/00
C 07 K 15/06

識別記号

K

庁内整理番号

8214-4B
8318-4H
8515-4B
8717-4B

⑭ 公開 平成2年(1990)9月3日

C 12 N 5/00
15/00B
D※

審査請求 未請求 請求項の数 2 (全7頁)

⑮ 発明の名称 新規ヒト・マクロファージ遊走阻止因子

⑯ 特 願 平1-39572

⑰ 出 願 平1(1989)2月20日

特許法第30条第1項適用 昭和63年11月21日、日本免疫学会発行の「日本免疫学会総会、学術集会記録、第18巻」に発表

⑱ 発 明 者 広 瀬 信 一 郎
⑱ 発 明 者 大 木 伸 司
⑱ 発 明 者 大 澤 利 昭
⑱ 発 明 者 樋 口 昌 宏
⑲ 出 願 人 三 共 株 式 会 社
⑲ 出 願 人 電気化学工業株式会社
⑳ 代 理 人 弁理士 大野 彰夫東京都品川区広町1丁目2番58号 三共株式会社内
東京都清瀬市元町1-3-4-304
東京都板橋区赤塚新町1-9-13
千葉県千葉市国生町1223-11 稲毛パークハウスD-401
東京都中央区日本橋本町3丁目5番1号
東京都千代田区有楽町1丁目4番1号

最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

新規ヒト・マクロファージ遊走阻止因子

2. 特許請求の範囲

1. 次の理化学的及び生物学的性質を有する新規ヒト・マクロファージ遊走阻止因子:

(1) 分子量: ゲル濾過法により 35,000 から 45,000 を示す。

(2) 等電点: クロマトフォーカシング法により $pI=7.5 \pm 0.5$ を示す。

(3) 温度安定性: 56℃で 30 分間加熱することによりマクロファージ遊走阻止因子活性を約 50% 失う。

(4) pH 安定性: pH 4.0 以下、及び、pH 10.0 以上でマクロファージ遊走阻止因子活性を失う。

(5) 紫外吸収: 280 nm において最大極大吸収を示す。

(6) プロテアーゼ感受性: トリプシン処理によりマクロファージ遊走阻止因子活性を失う。

(7) 阻害剤: L-フコースによりマクロファージ遊走阻止因子活性が阻害される。

(8) 種特異性: ヒト及びヒト以外の動物のマクロファージに対して、マクロファージ遊走阻止因子活性を有する。

(9) 他のサイトカインとの異同: インターフェロン γ 、インターロイキン1、腫瘍壊死因子及び顆粒球マクロファージコロニー刺激因子と異なる。

2. 請求項1記載のヒト・マクロファージ遊走阻止因子を分泌するヒトT細胞融合株を培養し、その培養液より、請求項1記載のヒト・マクロファージ遊走阻止因子を分離、精製する、請求項1記載のヒト・マクロファージ遊走阻止因子の製造法。

3. 発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明は、新規ヒト・マクロファージ遊走阻止因子及びその製造法に関するものである。

従来の技術

08/243,342 REF. CE 7815-008

マクロファージ遊走阻止因子 (Human Migration Inhibitory Factor, 以下M I Fと呼ぶ。) は、マクロファージの遊走を阻害する物質であり、炎症反応 (遅延型過敏性反応) の初期において決定的な役割を演ずる。従って、血清や血漿などの生体より得られた試料中のM I Fの量を測定することにより、上記炎症反応を診断することができる (米国特許 4,708,937 号)。

一方、M I Fは、単球及び無活動組織マクロファージが炎症性マクロファージに分化するのを誘導する。従って、M I Fは、感染に対する耐性、例えば結核、らい病又はレーシュマニアに対する耐性、及びキャンディダ症に対する耐性、並びに腫瘍、例えば転移に対する耐性を上昇せしめる (特開昭60-248617号)。

ヒトのM I Fを精製し、特徴づけを行なった報告が幾つかなされている (特開昭60-248617号、米国特許 4,708,937 号、Nature, vol.330, pp. 80-82, (1987)など)。

発明が解決する課題

(6) プロテアーゼ感受性：トリプシン処理によりマクロファージ遊走阻止因子活性を失う。

(7) 阻害剤：L-フコースによりマクロファージ遊走阻止因子活性が阻害される。

(8) 種特異性：ヒト及びヒト以外の動物のマクロファージに対して、マクロファージ遊走阻止因子活性を有する。

(9) 他のサイトカインとの異同：インターフェロン γ 、インターロイキン1、腫瘍壊死因子及び顆粒球マクロファージコロニー刺激因子と異なる。

本発明の新規ヒトM I Fの製造法を次に記す。

ヒトM I Fを産生するヒトT細胞融合株のクローンは、特公昭60-11889号に記載の方法に従うことにより得られる。特に本発明の新規M I Fを産生するヒトT細胞融合株クローンF5 (微工研菌寄第10534号) が好適である。

ヒトT細胞融合株の培養は、通常の動物細胞を培養する培地中で行なうことができる。

すなわち、培地は、ダルベッコ変法イーグル培

本発明者らは、ヒトT細胞融合株の培養外液に新規ヒトM I Fが分泌されることを見出し、該培養外液より上記新規ヒトM I Fを分離、精製して本発明を完成させた。すなわち、本発明は新規ヒトM I F及びその製造法に関するものである。

課題を解決するための手段

本発明の新規ヒトM I Fは以下の理化学的及び生物学的性質を有する。

(1) 分子量：ゲル濾過法により 35,000 から 45,000 を示す。

(2) 等電点：クロマトフォーカシング法により $pI=7.5 \pm 0.5$ を示す。

(3) 温度安定性：56℃で 30 分間加熱することによりマクロファージ遊走阻止因子活性を約 50% 失う。

(4) pH 安定性：pH 4.0 以下、及び、pH 10.0以上でマクロファージ遊走阻止因子活性を失う。

(5) 紫外外部吸収：280 nm において最大極大吸収を示す。

地、RPMI-1640 培地、Enriched-RDF 培地等が用いられるが、好適には、Enriched-RDF 培地が用いられる。

これらの培地に 2~5% の子牛胎児血清を含有させたもの (以下、含血清培地と呼ぶ。) が通常の培養に用いられる。

培養は、CO₂インキュベーターを用いて行なわれ、約 5% のCO₂濃度にて行なわれる。培養温度は、約 37℃が望ましい。

ヒトT細胞融合株よりヒトM I Fを産生させることは、コンカナバリンAなどのマイトゲン、及び、フォルボールミリスチンアセテートなどの発癌プロモーターを含有させた上記含血清培地中で、ヒトT細胞融合株を培養させること (以下、この培養をT細胞融合株の活性化と呼ぶ。) により行なうことができる。

マイトゲンの濃度は、1~100 $\mu\text{g/ml}$ で行ない得るが、好適には 10 $\mu\text{g/ml}$ である。発癌プロモーターの濃度は、1~100 ng/ml で行ない得るが、好適には 10 ng/ml である。

培養時間は、1-5 日間で行ない得る。

後に行なわれる精製操作を容易にするために、T細胞融合株の活性化の後に、該株をEnriched-RDF 培地などの無血清培地中で 3-5 日培養してもよい。

このようにして得られたヒトMIFを含有する培養外液材料にして、ハリントンらのアガロース法 (J. Immunology, vol.110, 752-759) に従ってマクロファージ遊走阻止因子活性を測定することにより、通常の蛋白質の分離、精製に用いられる方法にてヒトMIFを得ることができる。例えば、塩析法、遠心分離操作法、各種クロマトグラフィー法等を適宜組み合わせることでヒトMIFを得ることができる。

各種クロマトグラフィー法としては、疎水性クロマトグラフィー法、イオン交換クロマトグラフィー法、ゲル濾過法、アフィニティクロマトグラフィー法などが用いられる。

本発明のヒトMIFは、各種の目的に応じた使用が可能である。

により3回遠心洗浄を行なった。細胞を同じ培地に懸濁させた。

この細胞を、 2×10^7 細胞/ml となるように、37℃に保温しておいた 15% のモルモット血清及び 0.2% のアガロースを含むMEM培地に懸濁させ、ハミルトンシリンジにより 96 ウェルプレート (コースター社) に 1 μ l の滴として滴下した。4℃にて5分、37℃にて5分静置し、この懸濁液を固化せしめた (以下、アガロース滴と呼ぶ。)

MIF活性を測定する試料には、15% のモルモット血清を加えた (以下、試料液と呼ぶ。)。対照液としては15% のモルモット血清を含むMEM培地を用いた。

100 μ l の試料液を、上記の、腹腔浸出細胞懸濁液を滴下して固化せしめた 96 ウェルプレートに加え、5% 炭酸ガス気流中で 37℃にて12-16時間インキュベートした。アガロース滴からのマクロファージの遊走距離を顕微鏡下にて測定した。

対照液を用いたときのマクロファージの遊走距

例えば、血清や血漿などの、ヒトから得られた試料中に存在する該MIFを定量する診断操作の対照物質として用いられ得る。即ち、該MIFを酵素や放射性同位元素で標識することにより、該試料中の該MIFを拮抗的イムノアッセイで定量する際の、標識抗原として用いられ得る。

また、本発明のMIFを慢性感染症患者の感染部位に投与することにより、耐性を上昇せしめることが期待される。この場合、本発明のMIFの有効量と適切な希釈剤及び薬理学的に使用しうる担体の組成物として投与される。

次に、実施例により本発明をさらに詳しく説明する。

実施例1. MIF活性の測定

ヒトMIF活性は、ハリントンらのアガロース法 (J. Immunology, vol.110, 752-759, (1983)) に従って測定した。次に詳細を記す。

7週齢のハートレー系モルモットに 20 μ l の流動パラフィン (メルク社) を腹腔内投与した。3-4日後、腹腔浸出細胞を採取し、MEM培地

を100% 遊走とし、試料液を用いたときのこれに対する遊走距離の阻止率を該試料液のMIF活性とした。

実施例2. ヒトT細胞融合株F5の調製

特公昭60-11889号に記載された方法で、ヒトT細胞融合株F5を得た。以下にその詳細を記す。

ヒト末梢血より無菌的に分離したリンパ球 (以下、PBL細胞と呼ぶ。) を、10% の子牛胎児血清を含有する RPMI-1640 培地 (Gibco 社) に懸濁し、次に、刺激物質としてフィトヘムアグルチニン-P (以下、PHA-Pと呼ぶ。) を 1 μ g/ml となるように加え、37℃にて 5% 炭酸ガス気流中に2日間静置培養した。次に、N-アセチルガラクトサミンを 0.1 M になるように添加し、PBL細胞に結合したPHA-Pを解離させた後、PBL細胞を上記 RPMI-1640 培地にて遠心洗浄し、同培地に再懸濁することによりPHA-P刺激PBL細胞浮遊液を得た。

一方、ヒト急性白血病細胞株CEM (特公昭60-11889号) を上記の 10% の子牛胎児血清を含有

する RPMI-1640 培地を用いて、37℃にて 5% 炭酸ガス気流中に 2 日間静置培養した。培養後、この CEM 細胞を上記 RPMI-1640 培地で遠心洗浄した後、上記の 10% の子牛胎児血清を含有する RPMI-1640 培地中に細胞濃度が 2×10^6 細胞/ml になるように再懸濁した。

次に、不可逆的な蛋白質合成阻害剤であるエメチン塩酸塩を最終濃度が $10^{-4} \sim 10^{-5}$ M になるように、また、RNA 合成阻害剤であるアクチノマイシン D を最終濃度が $0.05 \sim 0.2 \mu\text{g/ml}$ になるように、それぞれ上記 CEM 細胞懸濁液に添加し、37℃にて 5% 炭酸ガス気流中に 2 時間静置培養した。この CEM 細胞を上記 RPMI-1640 培地で遠心洗浄した後、同培地に再懸濁した。

以上のように調製した PBL 細胞と CEM 細胞を 10:1 の比で混合し、遠心により細胞を沈殿させた。上清を除去後、沈殿した細胞に、37℃に保温しておいた、15% ジメチルスルホキシド及び $5 \mu\text{g/ml}$ のポリ-L-アルギニンを含有する、0.5 ml の 46% ポリエチレングリコール-1540

(和光純薬工業(株)製)をゆっくりとかきまぜながら加え、二種の細胞を融合せしめた。1 分後に 37℃に保温しておいた 10 ml の RPMI-1540 培地をゆっくりとかきまぜながら加えた。

遠心して上清を除去した後、10% の子牛胎児血清を含む RPMI-1640 培地に、融合細胞が 2×10^5 細胞/ml になるように懸濁し、さらにフィダーレイヤーとしてマイトマイシン C 処理した CEM 細胞を 8×10^4 細胞/ml 含有せしめ、該懸濁液を 96 ウェルカルチャープレートの各ウェルに 0.2 ml ずつ入れて、37℃にて 5% 炭酸ガス気流中に培養した。培養後 1 週間は、毎日培養液を半分ずつ交換した。

融合細胞の増殖が認められたウェルの培養上清について、実施例 1 に記載した方法に従って MIF 活性を測定した。

MIF 活性が確認されたウェルの融合細胞を限界希釈法により 2 回クローニングして、MIF を分泌するヒト T 細胞融合株 F5 (以下、F5 細胞と呼ぶ。)を得た。

実施例 3. F5 細胞の活性化

F5 細胞を、2% の子牛胎児血清を含む Enriched RDF 培地(極東製薬工業(株)製)中で、5% 炭酸ガス気流中で 37℃にて 3 日間培養後、さらに $10 \mu\text{g/ml}$ のコンカナバリン A、及び、 $10 \mu\text{g/ml}$ のフォルボールミリスチンアセテートを含む、2% の子牛胎児血清を含む Enriched RDF 培地に 1×10^6 細胞/ml となるように懸濁して、5% 炭酸ガス気流中で 37℃にて 1 日間培養した。

この F5 細胞を Enriched RDF 培地で遠心洗浄後、Enriched RDF 培地に 1×10^6 細胞/ml となるように懸濁して、5% 炭酸ガス気流中で 37℃にて 3 日間培養し、ヒト MIF 含有培養外液を得た。

実施例 4. MIF の分離、精製

実施例 1 に記載した方法に従い MIF 活性を測定することにより、実施例 3 に記載した培養上清液よりヒト MIF を精製した。以下の操作は、すべて 4℃にて行なった。

上記培養外液 50 l をフィルトレーション濃縮装置(富士フィルター工業(株))で約 1 l に濃縮した後、10,000 r.p.m.、60 分間遠心し、上清を得た。硫酸アンモニウムの粉末を最終濃度が 1 M になるようにゆっくりと攪拌しながら加え、一夜放置した。夾雑蛋白質を除去するために 10,000 r.p.m. で 60 分間遠心して上清画分を得た。リン酸を用いて、この画分の pH を 6.8 に調整した。

次にこの上清を、1 M 硫酸アンモニウムを含有する 10 mM リン酸緩衝液 (pH 6.8) で平衡化したフェニルセファロース CL-4B (ファルマシア社)のカラム (55 mm ID x 500 mm) に供与した。2 l の 1 M 硫酸アンモニウムを含有する 10 mM リン酸緩衝液 (pH 6.8) で非吸着画分を溶出除去し、次いで 2 l の 10 mM リン酸緩衝液 (pH 6.8) でカラムに吸着した夾雑蛋白質画分を溶出除去し、さらに、500 ml の 20 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 9.0) にてヒト MIF を含有する吸着画分 (200 ml) を溶出させた。

この画分を 5 l の 10 mM MES 緩衝液 (pH

6.5) に対して5時間、2回透析した。次いで、該緩衝液で平衡化させたS P-オートヨパール 650S (東ソー社(製)) カラム (30mm ID x 300 mm) に供与した。200 ml の10 mM MES緩衝液 (pH 6.5) で非吸着画分を溶出させた後、200 ml の0.25 M の塩化ナトリウムを含む10 mM MES緩衝液 (pH 6.5) で、ステップワイズ法により、ヒトMIFを含有する吸着画分 (約100 ml) を溶出させた。

この画分を、3 l の10 mM MES緩衝液 (pH 6.5) に対して5時間、2回透析した。次いで、この画分を該緩衝液で平衡化したS P-オートヨパール 650S カラム (30mm ID x 300 mm) に供与した。あらかじめ、150 ml のカラムを洗浄した後、0~0.25 M の塩化ナトリウムの直線濃度勾配により、イオン交換クロマトグラフィー法を行なった。ヒトMIFは、塩化ナトリウム0.10~0.15 M の範囲に溶出したのでこの画分 (約80 ml) を採取した。

この画分を、1 l の0.15 M 塩化ナトリウムを

含む20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) で平衡化したRCA-アガロース4B (豊年製油(株)) カラム (約10 ml) に供与した。100 ml の該緩衝液 (pH 7.4) で非吸着画分を溶出させたところ、MIF活性はカラムを通過する画分よりやや遅れて溶出した。次に100 ml の0.3 M ラクトースを含む該緩衝液で吸着画分を溶出させてもMIF活性は見出されなかった。この結果を、第1図に示す。図の縦軸はMIF活性、横軸は溶出容積を示し、図の矢印において0.3 M ラクトースを含む該緩衝液を供与した。図の斜線で示した画分を採取し、精製ヒトMIF画分 (約20 ml) とした。

精製ヒトMIF画分について、実施例1に記載した試料液中の、ヒトMIF画分の濃度が10% 及び40% のものを調製し、MIF活性を測定した。この結果を表1に示す。

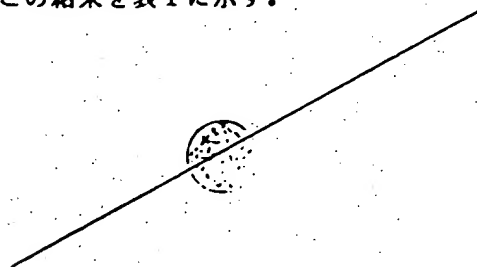


表1 精製ヒトMIF画分のMIF活性

試料液中のヒト MIF画分の濃度 (%)	MIF活性 (%) \pm SD
10	20.1 \pm 0.2
40	40.6 \pm 0.3

実施例5. 精製MIFの特徴づけ

実施例4で得られた精製ヒトMIFについて、理化学的及び生物学的性質をしらべた。

(1) 分子量:

セファクリルS-200 (ファルマシア社) カラムを用いてのゲル濾過法により35,000 から45,000 を示した。

(2) 等電点:

ポリバッファー交換体 (ファルマシア社) カラムを用いてのクロマトフォーカシング法により

pI=7.5 \pm 0.5 を示した。

(3) 温度安定性:

56℃で30分間加熱することによりMIF活性を約50% 失った。

(4) pH 安定性:

4℃、2時間の条件下で、pH 4.0 以下、及び、pH 10.0 以上でMIF活性を失う。

(5) 紫外吸収:

20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) 中で、280 nm において極大吸収を示し、250 nm 以下の波長で末端吸収を示した。

(6) プロテアーゼ感受性:

0.15 M の塩化ナトリウムを含有する10 mM リン酸緩衝液中で、トリプシンにより37℃で30分間処理したところ、MIF活性は完全に消失した。

(7) 阻害剤:

MIF活性の測定時に、実施例1記載の試料液中にL-フコースを0.1 M になるように添加させたところ、MIF活性は完全に阻害した。

(8) 種特異性:

ヒト及びモルモットのマクロファージに対してMIF活性を示した。

(9) 他のサイトカインとの異動:

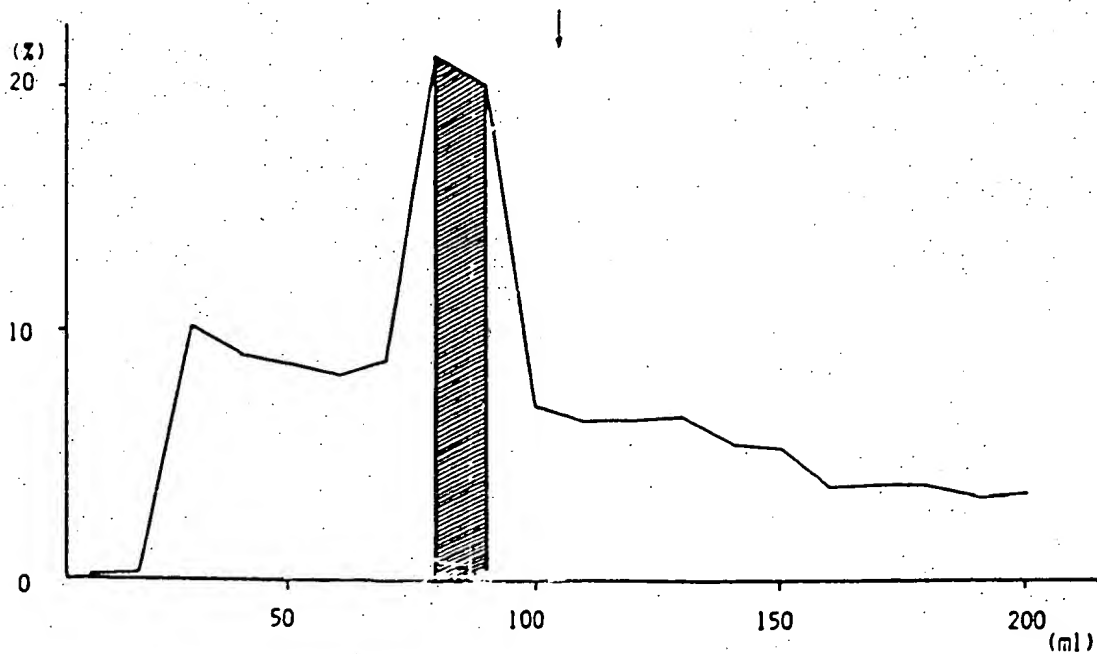
精製ヒトMIFの活性は、抗ヒトインターフェロン γ 抗体、抗インターロイキン1抗体、抗ヒト腫瘍壊死因子抗体、及び、抗顆粒球マクロファージコロニー刺激因子抗体で中和されず、ヒトMIFは、これらの因子と免疫学的に異なっていた。

4. 図面の簡単な説明

第1図は、RCA-アガロースを用いたアフィニティクロマトグラフィー法による溶出パターンを示す。

特許出願人 三共株式会社
電気化学工業株式会社
代理人 弁理士 大野 彰夫

第1図



第1頁の続き

⑤Int.Cl.³

// A 61 K 37/02

C 12 N 5/22

15/07

(C 12 P 21/00

C 12 R 1:91)

識別記号

庁内整理番号

ABB

ADX

8615-4C

手続補正書(自発)

平成2年1月8日

特許庁長官様

1. 事件の表示

平成1年特許第39572号

2. 発明の名称

新規ヒト・マクロファージ遊走阻止因子

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 〒103 東京都中央区日本橋本町3丁目6番1号

名称 (185)三共株式会社(外1名)

代表者 取締役社長 阿村 貞典

4. 代理人

住所 〒140 東京都品川区広町1丁目2番5号

三共株式会社内

電話 492-3131

氏名 弁護士 (8140) 大野 敏夫

5. 補正により増加する請求項の数 なし

6. 補正の対象 明細書の発明の詳細な説明の項

7. 補正の内容 明細書の通り

方式
密交

(1) 明細書第3頁1~2行の

「Migeration」を「Migration」と訂正する。

(2) 同第13頁6行の

「10 μ g/ml」を「10 ng/ml」と訂正する。

(3) 同第15頁14行の

「150 ml のカラムを」を「150 ml の緩衝液で
カラムを」と訂正する。

(4) 同第18頁13~14行の

「リン酸緩衝液中」を「リン酸緩衝液(pH 7.4)
中」と訂正する。